

平成13年度

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

牛海綿状脳症（BSE）に関する研究

主任研究者 品川 森一 帯広畜産大学 獣医公衆衛生学

研究要旨

- 1 神経症状を呈した牛207頭は全て BSE の異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 2 検査した18ヶ月齢以上の羊22頭及び山羊2頭はそれぞれスクレイビーの異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 3 全頭検査で2頭が BSE の異常プリオン蛋白陽性であった。
- 4 ウエスタンプロット法の簡便化および迅速化を行い、所要時間およそ8時間、現行 ELISA の4倍以上の高感度化が実現し、プロトコルを作製した。
- 4 免疫組織化学的診断法の迅速法を開発し、積算時間12時間までに迅速化した。本法を用いて、2頭の BSE 陽性牛の確定診断を行った。プロトコルを作製した。
- 5 背割り前の脊髄除去法と脊髄汚染を調べ、吸引式で脊髄除去率が高いものは汚染は低いが、硬膜が残存し、大阪押出式は、脊髄の除去率が高いが汚染も高い傾向があった。千葉改良押出式は脊髄の除去率が高く汚染は低い傾向があった。吸引式と押出式の優劣を付けられなかった。
事前の脊髄除去は枝肉への脊髄組織の付着防止上で有効で、十分な枝肉洗浄併用により、枝肉の脊髄組織汚染・残留を防止できる。
- 6 ビッシングによる中枢神経組織の血液中への混入は大部分が陰性であったが、検出限界を越すものが少数存在し、ビッシングによる中枢神経組織の血液中への混入はないと結論できなかった。
- 7 海外文献情報から、BSE の羊及び山羊発生の危険性が危惧され、それらの特定危険部位とその除去を決定した。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関
における職名

品川 森一・帯広畜産大学・教授
堀内 基広・帯広畜産大学・助教授
古岡 秀文・帯広畜産大学・助教授
沢谷 広志・神奈川食肉衛生検査所・所長

A. 研究目的

我が国では過去にEUからの牛および肉骨粉の輸入があったこと、および羊のスクレイビーが散発していることから、我が国におけるBSEおよび羊スクレイビーの存在状況に関する正確な情報を得ることを目的としてサーベイランスを実施する。

本年9月には国産牛での発生が報告され、屠殺牛の全頭検査が開始された。そこで、と畜場でと殺解体され、スクリーニング検査（ELISA）において陽性と判定された牛を対象に、確認検査を実施するウエスタンプロット法及び免疫組織化学の迅速化と高感度化を計り、プロトコルの作製を目的とした。

さらに、牛の特定危険部位（脳、眼、脊髄、回腸遠位部）を確実に除去できる手法及び特定危険部位が可食部に付着しないと

畜・解体方法について研究・開発するとともに、これらの部位の可食部への汚染状況等を調査・検証することにより、食肉の安全性の確保を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1 プリオン病調査

全国各地のと畜場に搬入された牛で神経症を示すもの、および18ヶ月齢以上の羊及び山羊を対象にウエスタンプロット法によるBSE及びスクレイビーの検査を行い、BSE及びスクレイビーに関する疫学研究を行った。全頭検査開始後はELISAによるスクリーニング検査で陽性と判定されたものを対象に、確認検査としてウエスタン・プロット法、病理組織学的検査、免疫組織化学的検査等を行い、最終的に専門家による確定診断を実施するとともに、と畜検査員への技術移転を行った。

2 と畜・解体法等の研究・開発

諸外国におけるBSE診断法に関する情報を収集し、診断に関するマニュアルを作成するとともに、モデルとなると畜場を選定し、と畜・解体作業における特定危険部位（脳、眼、脊髄、回腸遠位部）の除去方法等について、諸外国における実態等を参考に、わが国のと畜場に見合った簡便かつ迅

速な手法について開発した。

特に、背割り工程による枝肉への脊髄の飛散については、脊髄組織に多く含まれる GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein グリア細胞繊維性酸性タンパク質) を ELISA 法により検出し、適切な背割りの方法を開発・検証するとともに、枝肉への脊髄の付着状況、トリミング肉への残留状況等について調査した。

3 都道府県において実施しているスクリーニング検査に対する外部精度管理の実施

都道府県の食肉衛生検査所において実施しているスクリーニング検査 (ELISA 法) 結果の信頼性を確保するため、外部精度管理を実施する。

(倫理面への配慮)

実験動物使用時は帯広畜産大学動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に従い、動物に与える苦痛を最小とするため、接種時および淘汰時は麻酔下で実施し、使用動物数は必要最小限に止めた。

C. 研究結果

1 神経症状を呈した牛207頭を検査し、全て BSE の異常プリオン蛋白は陰性であった。検査した18ヶ月齢以上の羊22頭及び山羊2頭はそれぞれスクレイビーの異常プリオン蛋白は陰性であった。

2 全頭検査で ELISA 陽性で確認検査を行った検体の内、2頭が BSE の異常プリオン蛋白陽性であった。

3 帯広畜産大学で確立されたウエスタンプロット法による PrP^{Sc} の検出法を基に、簡便化および迅速化を行い、所要時間およそ8時間、一次スクリーニングで使用されている ELISA に比べ4倍以上と、迅速化及び高感度化が実現した。均一な確定検査を可能にするためにプロトコル化を行った。

4 免疫組織化学的診断法の迅速化の開発を行い、検査の精度を保ったまま、積算時間12時間までに迅速化した。開発された迅速診断法を用いて、確定診断を行った。2頭の BSE 陽性牛の確定診断を行った。均一な確定検査を可能にするためにプロトコル化を行った。

5 背割り前の異なる脊髄除去法と各方法によって処理された枝肉等の脊髄汚染を、神経組織のグリア細胞に特異的な GFAP を指標に調べ比較した。吸引式で、脊髄除去率が高いものは汚染は低い。硬膜が残存し、大阪押出式は、脊髄の除去率は高いが汚染も高い傾向があった。押出圧力を改良した千葉押出式は、

脊髄の除去率が高いが汚染は低い傾向があった。即ち、今回の調査では、吸引式及び押出式の優劣を付けられなかった。しかし、事前に脊髄除去をすることは枝肉への脊髄組織の付着を防止する上で有効であり、かつ枝肉洗浄を十分行うことにより、枝肉への脊髄組織付着及び残留を防止できるとの結論が得られた。

6 ビッシングによる中枢神経組織の血液中之への混入の調査で、大部分は検出限界以下であったが、わずかに検出限界を越すものが少数存在した。採血時の技術的な問題か、ELISA 法の疑陽性が判定できなかったため、ビッシングによる中枢神経組織の血液中之への混入はないと結論できなかった。

6. 班員外の専門家を加えた研究班会議を5回開催し、BSE の診断法の検討、背割りと脊髄の汚染を検討した。また、汚染飼料による羊 BSE の発生の危険性が文献検索で明らかとなり、羊及び山羊の特定危険部位とその除去を決定した。

D. 考察

1 BSE のパッシブサーベイランスでは検査頭数が207頭と少数で、陽性個体を検出できなかった。全頭検査が実施され、2ヶ月以内に2頭が BSE 陽性と判定された。BSE 発生の情報により、高齢牛の屠畜場への出荷制限あるいは自主規制が行われて居ると聞く。この所為か、以後4ヶ月経ても陽性例が見つからない。食肉の安全性確保の上で全く問題はないが、正確に我が国の BSE の状況を把握すると言う点では問題である。

羊及び山羊のスクレイビーのアクティブサーベイランスの結果も全て陰性であった。過去において、我が国のスクレイビー汚染は特定の地域以外は殆ど無く、汚染牧場での羊飼養が放棄されたり、我が国全体の羊飼養頭数が激減したことから、国内全体の汚染は極くわずかと推定される。このため、今回のサーベイランスでは陽性例が検出できなかったであろう。

2 BSE の確認検査に用いられるウエスタンプロット法が改良され、迅速化してサーベイランスに用いられる ELISA 法より感度が高いことは、確認検査の有効性を保証するもので、免疫組織化学による検査法も飛躍的に迅速化と共に食肉の安全性を確保するうえで重要な点である。

3 今回の背割りによる脊髄組織による枝肉の汚染調査から、あらかじめ脊髄を

除去することが、汚染の防止に重要なことが明らかとなった。脊髄除去の方法は大きくわけて吸引法と押し出し法が有る。何れが良いか結論が出なかった。ピッシングによる血液の中樞神経系組織の混入に付いては結論が得られなかった。ピッシングの中止について論議するためには更なる検討が行われる必要がある。

E. 結論

- 1 神経症状を呈した牛207頭は全てBSEの異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 2 検査した18ヶ月齢以上の羊22頭及び山羊2頭はそれぞれスクレイビーの異常プリオン蛋白は陰性であった。
- 3 全頭検査で2頭がBSEの異常プリオン蛋白陽性であった。
- 4 ウエスタンブロット法の簡便化および迅速化を行い、所要時間およそ8時間、現行ELISAの4倍以上の高感度化が実現し、プロトコールを作製した。
- 5 免疫組織化学的診断法の迅速法を開発し、積算時間12時間までに迅速化した。本法を用いて、2頭のBSE陽性牛の確定診断を行った。プロトコールを作製した。
- 6 脊髄除去法と枝肉等の脊髄汚染を調べて、吸引式と押し出し式の優劣が付けられなかった。
- 7 事前の脊髄除去は枝肉への脊髄組織の付着防止上で有効で、十分な枝肉洗浄併用により、枝肉の脊髄組織汚染・残留を防止できる。
- 8 ビッシングにより中枢神経組織の血液中への混入は大部分が陰性であったが、ピッシングによる中枢神経組織の血液中への混入はないと結論できなかった。
- 9 BSEプリオン汚染飼料による羊及び山羊の発症の可能性が認められ、特定危険部位が決定されその除去が必要と委員会結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Matsuo, T., and Kaneko, K. (2001) Glycidol degrades scrapie mouse prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 983-990.
- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L-W. and Caughey, B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol.*

the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.*, 276: 15489-15497.

Horiuchi, M., Nemoto, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., Furuoka, H., Matsui, T., Mohri, S. and Shinagawa, M. Biological and biochemical properties of sheep scrapie agents in Japan. (Submitted)

品川森一、堀内基広、松井高峯(2001) プリオンの免疫学的検出法 生活衛生 45: 259-269.

池田徹也、堀内基広、古岡秀文、石黒直隆、品川森一 (2002) 牛海綿状脳症に関する検査概要と今後の対応 食品衛生研究 52: 33-42.

堀内基広 (2001) 動物のプリオン病 ウイルス 51: 145-150

2. 学会発表

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一：モンゴルの羊におけるプリオン蛋白質のアミノ酸多型 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

堀内基広、石黒直隆、品川森一：PrP合成ペプチドによるPrP分子相互作用の阻害 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

山本真理、品川森一、石黒直隆、堀内基広：エポキシ化合物によるプリオン不活化 第131回日本獣医学会学術集会（東京）2001年4月

ゴンボジャブアルタンゲレル、堀内基広、石黒直隆、品川森一、毛利資郎、高田益宏：羊PrP遺伝子Tgマウスの羊スクレイビープリオンに対する感受性 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、木村久美子：精製PrP^{Sc}画分と特異的に反応するmAb 6H10の解析 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

金チャンラン、毛利崇、狩野綾子、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体パネルの作製 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月

毛利崇、堀内基広、石黒直隆、品川森一、梅谷淳、松井利生、柳谷孝幸：免疫磁性ビーズを用いたプリオン蛋白質検出法の開発 第49回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2001年11月